

УДК 575.224.46.044

**МУТАГЕННОЕ ДЕЙСТВИЕ ЭКСТРАКТОВ
РАСТЕНИЙ КАРТОФЕЛЯ *SOLANUM TUBEROSUM* L.,
ОБРАБОТАННЫХ ПЕСТИЦИДАМИ**

Н.С. Карамова, А.П. Денисова, З. Сташевски

Аннотация

Пестициды относятся к числу наиболее опасных антропогенных факторов окружающей среды в силу масштабов их распространения в биосфере и степени неблагоприятного воздействия на жизнедеятельность всех организмов. На сегодняшний день установлено, что не менее 50% химических препаратов, применяемых для защиты сельскохозяйственных растений, обладает генотоксической активностью.

В настоящей работе представлены результаты исследования токсических и мутагенных свойств экстрактов растений картофеля *Solanum tuberosum* L., обработанных пестицидами, применяемыми для защиты посадок производственных посадок семенного картофеля в Республике Татарстан. Водные и органические экстракты растений картофеля после обработки препаратами актара, фастак, моспилан, пенкоцеб в лабораторных условиях, а также комплексом пестицидов во время вегетации в полевых условиях не оказывали значимого токсического и мутагенного действия на тестерный штамм *Salmonella typhimurium* TA 100. Установлено, что водный экстракт листьев растений картофеля, обработанных пестицидом зенкор в условиях *in vitro*, проявляет слабый мутагенный эффект в тесте Эймса. Следовательно, накопление данного пестицида в растениях в количествах, вызывающих генные мутации, может представлять потенциальную опасность для окружающей среды, в том числе и для человека.

Ключевые слова: пестициды, растения картофеля, растительные экстракты, токсичность, мутагенность, *Salmonella typhimurium*, тест Эймса, биотрансформация пестицидов.

Введение

Использование химических средств защиты в борьбе с сорняками, болезнями и вредителями растений является одним из основных факторов в повышении эффективности сельскохозяйственного производства. Объем выпускаемых пестицидов и масштабы их применения ежегодно возрастают. В настоящее время более чем 1000 химических соединений классифицируются как пестициды [1], и около 2.5 млн. т химических средств ежегодно используется для защиты культурных растений во всем мире [2].

Теоретически пестициды должны селективно подавлять жизнедеятельность только определенного вида, однако хорошо известно, что данные соединения представляют потенциальную опасность для организмов разного уровня организации. Показано, что пестициды могут ковалентно связываться с различными нуклеофильными центрами клеточных биомолекул, включая ДНК [3], индуцируя при этом процессы канцерогенеза, тератогенеза и мутагенеза [4, 5].

Тем не менее в силу экономических причин на сегодняшний день невозможно существенно снизить масштабы использования пестицидов. Такая ситуация определяет необходимость дальнейших исследований, направленных как на оценку экологической безопасности уже применяемых препаратов, так и поиск новых, обладающих высокоселективным пестицидным действием, и в то же время не представляющих опасность для генофонда биосферы.

Многочисленные исследования с применением различных тест-систем позволили установить, что многие пестициды способны индуцировать повреждение ДНК, генные мутации и структурные изменения хромосом в модельных тест-объектах [3, 5, 6]. В литературе также имеются данные о том, что экстракты различных видов растений, обработанных пестицидами, обладают генотоксическим эффектом, который обусловлен содержанием в них остаточных количеств пестицидов или их метаболитов [7–10].

Таким образом, с учетом того, что растения являются важной составной частью пищевых цепей, одним из подходов для более точного прогнозирования потенциальной опасности пестицидов является оценка генотоксического эффекта экстрактов культурных растений.

Целью настоящей работы являлось исследование мутагенной активности экстрактов растений картофеля *Solanum tuberosum* L. обработанных пестицидами в лабораторных и полевых условиях.

2. Материалы и методы

В работе в качестве опытной культуры были использованы растения картофеля, сорт Невский. Для обработки растений было выбрано 5 пестицидов, которые наиболее часто используются для химической защиты посадок картофеля в Республике Татарстан.

Зенкор (метрибузин). Действующее вещество – 4-амино-6-трет-бутил-3-(метилтио)-1,2,4-триазинон-5. Гербицид, действующий через листья и почву, уничтожая двудольные сорняки и сорные злаки. Производитель – фирма «Байер АГ».

Актара (тиаметоксам). Действующее вещество – 5-метил-3-(2-хлортиазол-5-илметил)-1,3,5-оксадиазинан-4-илиден-N-нитроамин. Внутрирастительный инсектицид, воздействующий на ацетилхолиновый рецептор нервной системы насекомых. Производитель – фирма «Новартис Протекшн АГ».

Моспилан (ацетамиприд). Действующее вещество – N¹-метил-N¹-[(6-хлор-3-пиридил)метил]-N²-цианацетамидин. Системный инсектицид контактно-кишечного действия, который взаимодействует с ацетилхолиновым рецептором постсинаптической мембраны как конкурент ацетилхолина. Производитель – фирма «Ниппон Сода Ко», ЛТД.

Фастак (альфа-циперметрин). Действующее вещество – смесь (1 : 1) изомеров циперметрина: (S)-α-циано-3-феноксibenзилового эфира (1R)-*цис*-3-(2,2-дихлорвинил)-2,2-диметилциклопропанкарбоновой кислоты и (R)-α-циано-3-феноксibenзилового эфира (1S)-*цис*-3-(2,2-дихлорвинил)-2,2-диметилциклопропанкарбоновой кислоты. Контактнo-кишечный пиретроидный инсектицид широкого спектра действия. Производитель – фирма «Цианамид».

Пенкоцеб (манкоцеб). Действующее вещество – комплекс этилен-*бис*-ди-тиокарбаматов цинка и марганца (с содержанием цинка и марганца 2.55 и 18%

соответственно). Фунгицид широкого спектра действия. Производитель – фирма «Серексагри С.А.» [11, 12].

Моделирование биотрансформации пестицидов растениями в условиях *in vitro*. В работе были использованы микрочеренки трехнедельных пробирочных растений картофеля, сорт Невский. В каждом опытном варианте было высажено по 80 растений *in vitro*. Растворы пестицидов (зенкор – 50 мкг/мл, пенкоцеб – 5 мкг/мл, актара – 50 мкг/мл, моспилан – 50 мкг/мл, фастак – 0.02 мкл/мл) добавляли в питательную среду Мурассиге – Скуга [13]. Растения выращивались в течение 3-х недель при 20–25 °С и освещении 10000 лк (люминесцентные лампы дневного света) при 16-часовом световом дне.

Приготовление растительных экстрактов. Правильный выбор метода приготовления экстрактов очень важен для максимального извлечения пестицидов, а также продуктов их биотрансформации органической и неорганической природы из растительного материала. В нашей работе для приготовления экстрактов были использованы листья растений картофеля, выращенных на синтетической среде с добавлением одного из исследуемых пестицидов, а также клубни растений картофеля, подвергшихся последовательной обработке пестицидами в полевых условиях. Для извлечения ксенобиотиков и их метаболитов из растительной ткани были использованы разные растворители.

Приготовление водных экстрактов. Собранные листья или клубни картофеля отмывали под струей водопроводной воды для освобождения от возможных внешних загрязнений, подсушивали при комнатной температуре. Растительный материал растирали в предварительно охлажденной ступке с добавлением охлажденного 0.1 М Трис-аскорбинового буфера (соотношение масса : объем – 1 : 1) [14]. Полученный гомогенат процеживали через двойной слой марли и центрифугировали 10 мин при 13000 об/мин. Полученный экстракт разливали по 1 мл в пробирки Эппендорф и хранили при –20 °С.

Приготовление органических экстрактов. Растительный материал растирали в предварительно охлажденной ступке, полученный гомогенат экстрагировали эфиром до получения прозрачного раствора. Органическую фракцию высушивали до полного испарения эфира и затем растворяли в ДМСО (соотношение масса : объем – 1 : 1). Приготовленный органический экстракт разливали по 1 мл в пробирки Эппендорф и хранили при –20 °С.

Полученные растительные экстракты были тестированы на токсичность и мутагенность в микробной тест-системе. В качестве контроля служили водные и органические экстракты, приготовленные из растений картофеля, которые не подвергались обработке пестицидами в лабораторных и полевых условиях соответственно.

Для оценки токсичности и мутагенности растительных экстрактов в работе использован штамм *Salmonella typhimurium* TA 100 (*his G46*, *rfaΔ*, *uvrB*, *bio*, *pKm 101*), любезно предоставленный профессором Б. Эймсом (В. Ames) (США). Токсичность экстрактов оценивали по проценту выживаемости, определяемой как отношение числа колоний тестерных бактерий, выросших в варианте с исследуемым экстрактом к числу колоний в контрольном варианте.

Мутагенность исследуемых экстрактов растений оценивали в полукOLIчественном тесте Эймса. Ауксотрофный по гистидину штамм *Salmonella typhimurium*

Табл. 1

Токсическое действие экстрактов растений картофеля, обработанных пестицидами в лабораторных и полевых условиях

Образцы	Выживаемость, %
Контроль	100
Водные экстракты листьев растений, обработанных пестицидами <i>in vitro</i> :	
Зенкор	63.0 ± 7.4
Моспилан	72.3 ± 8.3
Фастак	86.2 ± 9.2
Пенкоцеб	81.5 ± 4.7
Актара	89.2 ± 7.8
Органические экстракты листьев растений, обработанных пестицидами <i>in vitro</i> :	
Зенкор	78.4 ± 6.7
Моспилан	84.3 ± 5.3
Фастак	74.5 ± 7.1
Пенкоцеб	68.6 ± 11.0
Актара	113.7 ± 6.6
Экстракты клубней растений, обработанных комплексом пестицидов в полевых условиях:	
Водный экстракт	83.0 ± 5.1
Органический экстракт	73.0 ± 3.2

ТА 100 (*his G46*, *rfaΔ*, *uvrB*, *bio*, *pKm 101*) при действии мутагенных факторов может ревертировать к гистидиновой прототрофности (His^+) и позволяет регистрировать генные мутации. Эксперименты проводили согласно методике, описанной Мароном и Эймсом [15].

Статистическую обработку результатов проводили в стандартной компьютерной программе. Данные представлены в виде среднего значения ± среднеквадратическое отклонение. Для оценки достоверности различий между результатами в вариантах опыта использовали критерий Стьюдента [16]. При этом $p \leq 0.05$ принимали за достоверный уровень значимости.

2. Результаты и обсуждение

2.1. Токсические эффекты экстрактов листьев и клубней растений картофеля. Анализ полученных результатов показал, что водные экстракты листьев растений картофеля, выросших на среде с добавлением одного из исследованных пестицидов в условиях *in vitro*, не проявили ярко выраженной токсичности в отношении штамма *S. typhimurium* ТА 100 (табл. 1).

Некоторый токсический эффект показан при обработке растений картофеля зенкором (процент выживаемости тестерных бактерий составил 63%). Органические экстракты листьев растений картофеля, обработанных пестицидами в условиях *in vitro*, практически не оказывали токсического действия на штамм *S. typhimurium* ТА 100, за исключением варианта с добавлением пенкоцеба (процент выживаемости тестерных бактерий – 69%). Экстракт растений, обработанных пестицидом актара, вызывал даже некоторую стимуляцию роста тестерного штамма (табл. 1).

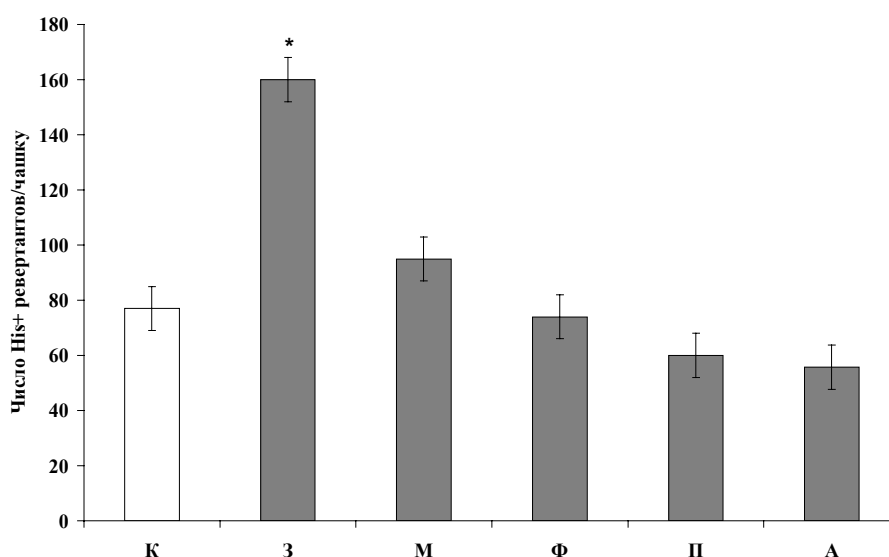


Рис. 1. Мутагенная активность водных экстрактов листьев растений картофеля, выращенных на среде с пестицидом в лабораторных условиях. К – контроль, З – зенкор, Ф – фастак, А – актара, М – моспилан, П – пенкоцеб. Звездочка обозначает: достоверно отличается от контроля, $p \leq 0.05$

Из данных, представленных в табл. 1, видно, что экстракты клубней растений картофеля, подвергшихся последовательной обработке пестицидами в полевых условиях, оказывали некоторое ингибирующее действие на рост тестерного штамма. При действии водного экстракта клубней картофеля на штамм *S. typhimurium* TA 100, процент выживаемости тестерных бактерий составил 83%, а при действии органического экстракта – 73%.

2.2. Мутагенная активность экстрактов листьев и клубней растений картофеля. Как видно из результатов, представленных на рис. 1, число колоний His⁺-ревертантов *S. typhimurium* TA 100, индуцированных водным экстрактом растений картофеля, выращенных на среде с гербицидом зенкор в условиях *in vitro*, более чем в 2 раза превышает спонтанный фон мутирования, что свидетельствует о слабой мутагенной активности данного экстракта.

Ранее было показано, что зенкор проявляет умеренный генотоксический эффект в SOS-хромостесте (метод микрочашек) [17], вызывает повреждения ДНК в эритроцитах головастика *Rana catesbeiana* [18]. Согласно данным Кайа с соавторами [19], зенкор не способен индуцировать ни соматические мутации, ни митотические рекомбинации в клетках *Drosophila melanogaster*. В то же время обработка семян данным гербицидом повышала уровень хромосомных aberrаций в клетках проростков ячменя (*Hordeum vulgare*) и гороха (*Pisum sativum*) [20]. Установлено, что зенкор не вызывает образование сестринских хроматидных обменов (СХО) в лимфоцитах периферической крови людей. Однако добавление в культуру лимфоцитов экстракта корней растений *Vicia faba*, предварительно обработанных зенкором, приводило к значительному повышению частоты образования СХО [10].

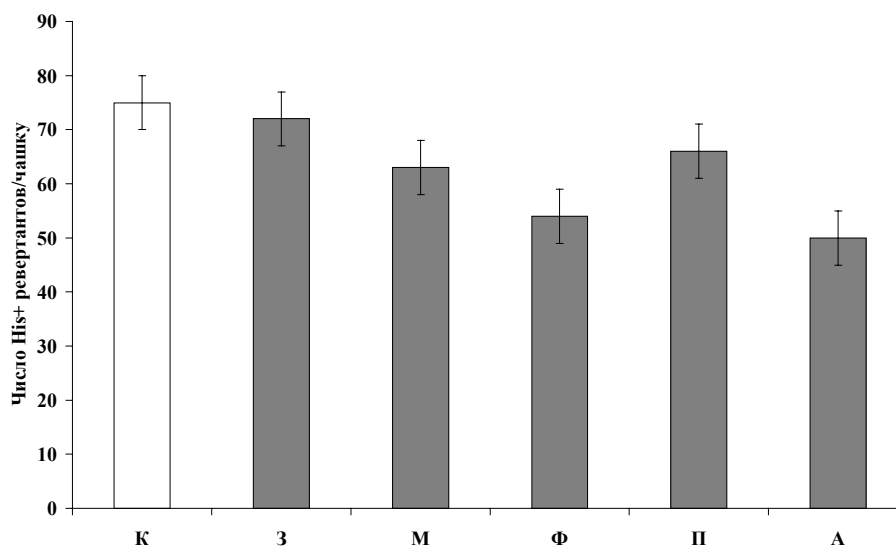


Рис. 2. Мутагенная активность органических экстрактов листьев растений картофеля, выращенных на среде с пестицидом в лабораторных условиях. К – контроль, З – зенкор, М – моспилан, Ф – фастак, П – пенкоцеб, А – актара

Нам не удалось обнаружить мутагенный эффект для экстрактов растений, обработанных препаратами актара, моспилан, фастак и пенкоцеб в условиях *in vitro* (рис. 1, 2).

Сведения о генотоксических эффектах данных пестицидов, имеющиеся в литературе, немногочисленны и в основном отражают результаты исследований с использованием клеток млекопитающих.

Инсектициды актара и моспилан не индуцировали генные мутации в клетках китайского хомячка с метаболической активацией и без нее, а также не увеличивали частоту появления микроядер *in vivo* [21, 22]. Инсектицид фастак проявил генотоксический эффект в микроядерном тесте и в тесте на хромосомные аберрации в клетках костного мозга мышей, а также мутагенную активность, индуцируя доминантные летальные мутации в половых клетках мышей [23]. Пенкоцеб является слабым мутагеном в тесте на *D. melanogaster*, в то время как продукт его разложения – этилентиомочевина (ЭТМ) – индуцирует сестринские хроматидные обмены и хромосомные транслокации в лимфоцитах рабочего персонала, контактирующего с данным препаратом [24].

Из результатов, представленных на рис. 3, видно, что экстракты клубней растений картофеля, подвергшихся последовательной обработке комплексом перечисленных выше пестицидов в полевых условиях, не вызывают значимого превышения числа колоний His⁺-ревертантов над таковым в контроле.

Таким образом, анализ полученных результатов показывает, что только водный экстракт листьев растений картофеля, выращенных на среде с гербицидом зенкор в условиях *in vitro*, обладает слабой мутагенной активностью. В то же время экстракты клубней картофеля, обработанных пестицидами, в том числе и зенкором в полевых условиях, не проявили мутагенного эффекта. Данный факт можно объяснить синергизмом действия пестицидов и, возможно, влиянием окружающей среды.

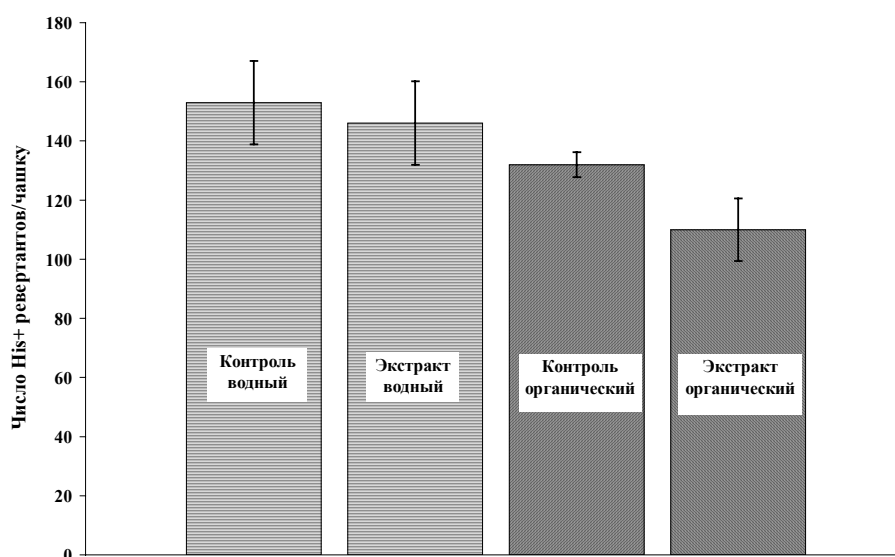


Рис. 3. Мутагенная активность экстрактов растений картофеля, обработанных пестицидами в полевых условиях, в тесте Эймса

Следует подчеркнуть, что результаты, свидетельствующие о мутагенном эффекте гербицида зенкор и экстрактов растений картофеля, выросших на среде с зенкором, должны быть учтены при использовании данного препарата. Накопление зенкора в растениях в количествах, вызывающих генные мутации, может представлять опасность для окружающей среды, в том числе и для человека.

Summary

N.S. Karamova, A.P. Denisova, Z. Stasevski. Mutagenicity Study of Extracts from Pesticide-Treated Potato Plants.

Pesticides are extensively used to enhance efficiency of agricultural productivity and crop yields. Large amounts of these chemicals being released into the environment, and many of them affecting non-target organisms, they represent a potential hazard to ecosystem health. Many studies have shown that the majority of pesticides possess genotoxic properties inducing DNA damages, mutations, chromosomal aberrations.

The article evaluates the toxic and mutagenic effects of extracts of potato plants *Solanum tuberosum* L. exposed to the pesticides under laboratory and field conditions. Water and DMSO extracts of potato plants treated with pesticides Actara, Mospilan, Fastac, Pencozeb in vitro did not demonstrate significant toxic and mutagenic effect in *Salmonella typhimurium* TA 100. Weak mutagenic activity was observed for water extracts of leaves from potato plants exposed to Sencor under in vitro conditions. Exposure to the water and DMSO extracts of potato tubers from plants treated with pesticides under field conditions did not induce a marked increase in number of His⁺ revertants in Ames test.

Thus, considering the accumulation of Sencor residues in plant tissues in dose inducing gene mutations, much attention should be given to controlling this pesticide in environment.

Key words: pesticides, potato plants, plant extracts, toxic effect, mutagenicity, *Salmonella typhimurium*, Ames test, biotransformation of pesticides.

Литература

1. Torres C., Ribas G., Xamena N., Creus A., Marcos R. Genotoxicity of four herbicides in *Drosophila* wing spot // Mutation Res. – 1992. – V. 280, No 4. – P. 291–295.
2. Van der Werf H. Assessing in the impact of pesticides on the environment // Agric., Ecosyst. Environ. – 1996. – V. 60, No 2–3. – P. 81–96.
3. Crosby D. Pesticides as environmental mutagens // Fleck R., Hollander A. (eds.), Genetic Toxicology: An agricultural Perspective. – New York, London: Plenum Press, 1982. – P. 201–218.
4. Alavanja M., Hoppin J., Kamel F. Health effects of chronic pesticide exposure: Cancer and neurotoxicity // Annu. Rev. Publ. Health. – 2004. – V. 25. – P. 155–165.
5. Bolognesi C. Genotoxicity of pesticides: a review of human biomonitoring studies // Mutation Res. – 2003. – V. 543, No 2. – P. 251–272.
6. De Bertoldi M. Genotoxic effects of pesticides // Eur. J. Cancer Prev. – 1996. – V. 5. – P. 397–399.
7. Feretti D., Zerbini I., Zani C., Ceretti E., Moretti V., Monarca S. *Allium cepa* chromosome aberration and micronucleus tests applied to study genotoxicity of extracts from pesticide-treated vegetables and grapes // Food Addit. Contam. – 2007. – V. 24, No 6. – P. 561–572.
8. Plewa V., Wagner E. Activation of promutagens by green plants // Annu. Rev. Genet. – 1993. – V. 27. – P. 93–113.
9. Dimitrov B., Gadeva P., Benova D., Bineva M. Comparative genotoxicity of the herbicides Roundup, Stomp and Reglone in plant and mammalian test systems // Mutagenesis. – 2006. – V. 21, No 6. – P. 375–382.
10. Flores-Maya S., Comez-Arroyo S., Calderon-Segura M.E., Villalobos-Pietrini R., Waliszewski S.M., Gomez de la Cruz L. Promutagen activation of triazine herbicides metribuzin and ametryn through *Vicia faba* metabolism inducing sister chromatid exchanges in human lymphocytes *in vitro* and in *V. faba* root tip meristems // Toxicol. Vitro. – 2005. – V. 19. – P. 243–251.
11. Ассортимент средств защиты растений, включающий новые поколения биопестицидов, БАВ, экологически безопасные пестициды и аналоги природных соединений. Инсектициды, акарициды, фунгициды, гербициды. Ч. 1–3. – СПб.: Изд-во РАСХН ВИЗР, 2000. – 80 с.
12. Список пестицидов и агрохимикатов, разрешенных к применению на территории Российской Федерации. 2000 г. // Защита и карантин растений. – 2000. – № 3. – С. 350.
13. Негрук В.И. Биотехнология растений: культура клеток. – М.: Агропромиздат, 1989. – 280 с.
14. Мусин С.М., Трофимец Л.Н. Использование белков микроклубней в идентификации генотипов (сортов, гибридов и линий) картофеля *in vitro* // Докл. ВАСХНИЛ. – М.: Агропромиздат. – 1988. – № 7. – С. 15–17.
15. Maron D., Ames B. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test // Mutation Research. – 1983. – V. 113, No 3–4. – P. 174–210.
16. Лакин Г.Ф. Биометрия. – М.: Высш. шк., 1990. – 352 с.
17. Venkat J., Shami S., Davis K., Nayak M., Plimmer J., Pfeil R., Nair P. Relative genotoxic activities of pesticides evaluated by modified SOS microplate assay // Environ. Mol. Mutagen. – 1995. – V. 25, No 1. – P. 67–76.

18. Clements C., Ralph S., Petras M. Genotoxicity of select herbicides in *Rana catesbeiana* tadpoles using the alkaline single cell gel DNA electrophoresis (comet) assay // Environ. Mol. Mutagen. – 1997. – V. 29, No 3. – P. 277–288.
19. Kaya B., Yanikoglu A., Creus R., Marcos R. Genotoxicity testing of five herbicides in the *Drosophila* wing spot test // Mutation Res. – 2000. – V. 465, No 1. – P. 77–84.
20. Кожуро Ю., Максимова Н. Цитогенетический анализ действия гербицидов гезагарда, гранстара, зенкора и симазина на проростки ячменя (*Hordeum vulgare*) и гороха (*Pisum sativum*) // Весці НАН Беларусі. Сер. біял. навук. – 2003. – № 1. – С. 45–58.
21. Regulatory Note – REG 2001-03. – Canada: Pesticide Management Regulatory Agency, 2001. – 51 p.
22. Regulatory Note – REG 2002-05. – Canada: Pesticide Management Regulatory Agency, 2002. – 114 p.
23. Shukla Y., Taneja P. Mutagenic potential of cypermethrin in mouse dominant lethal assay // J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol. – 2002. – V. 21, No 3. – P. 259–265.
24. Steenland K., Cedillo L., Tueker J., Hines C., Sorensen K., Deddens J., Crus V. Thyroid hormones and cytogenetic outcomes in backpack sprayers using etilenbis(ditiocarbamate) (EBDC) fungicides in Mexica // Environ. Health Perspect. – 1997. – V. 105, No 10. – P. 1126–1130.

Поступила в редакцию
15.09.08

Карамова Назира Сунагатовна – кандидат биологических наук, научный сотрудник НИЛ ББФ Казанского государственного университета.

E-mail: Nazira.Karamova@ksu.ru

Денисова Александра Петровна – кандидат биологических наук, младший научный сотрудник лаборатории химии окружающей среды Химического института им. А.М. Бутлерова Казанского государственного университета.

E-mail: alex-andrina@rambler.ru

Сташевски Зенон – заведующий лабораторией селекции картофеля Татарского НИИ сельского хозяйства, г. Казань.

E-mail: zenons@bk.ru